Резюме: В данной статье представлен анализ рентабельности молочно-товарных хозяйств Ростовской области и рассмотрены основные факторы, оказывающие прямое влияющие на ее уровень. Предложен ряд мероприятий по повышению эффективности скотоводства.

SUMMARY
The article presents the analysis of profitability of dairy farms in the Rostov region and the major factors which have a direct influence its level. Proposed a measures on increasing efficiency of cattle breeding.

Keywords: dairy cattle, profitability, reproduction, cattle

Литература

1. Аксенова П.В, Айбазов М.М., Коваленко Д.В. Биотехнологические методы и приемы интенсификации воспроизводства овец и коз //Овцы, козы, шерстяное дело. – 2012. – № 2. – С.35-38.
2. Аксенова П.В, Айбазов М.М., Коваленко Д.В. Рациональное использование генофонда зааненских производителей // Зоотехния, -2011.-№9.-С. 6-7.
3. Айбазов А.М.М., Аксенова П.В., Сеитов М.С. Современные биотехнологические методы направленного воспроизводства мелкого рогатого скота// Известия Оренбургского государственного аграрного университета, 2013. № 4 (42). С. 241-243.
4. Российский статистический ежегодник, 2012.- Федеральная служба государственной статистики. - 782 с.
5. Кутровский В.Н., Иванова Н.И. Рентабельность производства молока в стадах РФ с разным уровнем продуктивности коров и численности поголовья «Проект STRF.ru».-НИИСХ ЦРНЗ, 2009.- №1.
6. http://agrary.ru/животноводческие-и-птицеводческие-фермы-и-комплексы/технологии-и-средства-механизации-животноводства
7. апотко А.М. Энергоэкономический ресурс молочного скотоводства (часть 3) //Белорусское сельское хозяйство,,2007.- 8 (64).- С. 12-18.

Контактная информации об авторах для переписки
Аксенова П.В., Ермаков А.М., Грушевский И.Ю. - ГНУ Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт, 346421, Ростовское шоссе 0, г. Новочеркасск.

УДК 619:618:636.7

Ермакова И.А., Карташов С.Н., Карташова Е.В., Бутенков А.И.
(Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт)

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ СУК С НЕКРОЗОМ БЕРЕМЕННОЙ МАТКИ

Ключевые слова: некроз беременной матки у сук, Clostridium perfringens, токсины клостридий, генотипы клостридий, ПЦР.

Введение. Различные штаммы Clostridium perfringens классифицируются на пять различных токсинотипов (A, B, C, D и E), на основании способности продуцировать ими четыре основных токсина (α, β1, ε и ι). В отечественной литературе принято классифицировать штаммы Clostridium perfringens на те же группы но на основании диагностических сывороток, купирующих фатальный эффект у зараженных мышей, содержащих токсин нейтрализующие антитела соответствующих штаммов (серогруппы) (1).

C. perfringens токсинотипа А распространен повсеместно. Он способен вызывать гангрену у людей, гемморагическую и некротическую энтеропатию жвачных, абомазит у телят, некротический энтерит у домашней птицы и различные энтеропатии у многиох видов млекопитаю-

щих, включая собак и кошек. Токсинотип А продуцирует токсин α, кодируемый геном cpa, некоторые его штаммы способны продуцировать токсин β2, кодируемый геном cpb2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет определить наличие гена, ответственного за экспрессию того или иного токсина у конкретного изолята и установить токсинотип C. perfringens (3, 4, 6). У собак C. perfringens, вызывает тяжелое потенциально летальное заболевание – некроз беременной матки. Заболевание возникает в жаркое время года у собак с дистоциями, при невозможности родового процесса и открытой шейке матки. Характеризуется полным прекращением родового процесса, зловонными выделениями из родовых путей, быстрым ухудшением состояния животного вплоть до развития шока. На операции отмечается некрозы различных участков матки.

Цель этого исследования состояла в том, чтобы выяснить основные токсинотипы изолятов C. perfringens выделенных от здоровых и больных собак, а также от сук с некрозом беременной матки, провести сравнительный анализ.

Материалы и методы. Нами были исследованы четыре коллекции изолятов C. perfringens отобранные в 2009 и 2011 г. Изоляты первой коллекции были выделены из фекалий 43-х здоровых собак. Всего в исследовании участвовало 249 собак в возрасте от 6 до 11 лет, инцидентность выделения составила 17,3%.

Вторая коллекция получена из фекалий 7-и собак с различными поражениями желудочно-кишечного тракта. Всего в исследовании было 19 собак с различными заболеваниями кишечник. Инцидентность выделения составила 36,8%.

Изоляты третьей коллекции были получены из органов при вскрытии 27-и собак, всего в исследовании было 57 трупов, инцидентность выделения 47,3%. Изоляты четвертой коллекции, получены из полости удаленных маток от 12-и собак с диагнозом – «некроз беременной матки», где от всех животных была изолирована C. perfringens.

Обнаружение и идентификация Clostridium perfringens. Высевы из паренхиматозный органов проводим на МПА, МПБ, среду Китта-Тароцци. Из тонкого отдела кишечника только на среду Китта-Тароцци. Среду перед посевом регенерировали. Количество посевного материала 0,5-1 грамм.

Пробирки со средой Китта-Тароцци прогревали на водяной бане при температуре 650 С 10-ть минут для очистки от сопутствующей микрофлоры. Термостатировали 18-24 часа, при незначительном росте до 5 суток. Если наблюдали интенсивное помутнение и газообразование проводили микроскопирование. В положительных случаях отмечали наличие грубых, коротких, грамположительных палочек, проводили пересев петлёй на кровяной агар. Засеянные чашки инкубировали при 370 С в течение 24 часов в анаэробных условиях. При выделении C.perfringens получали крупные колонии с ровными краями, окружённые зоной неполного гемолиза. В последующем производили высев на молоко, в положительных случаях через 18-24 часа отмечалось свёртывание, образование сгустка казеина и отхождение прозрачной сыворотки.

Анализ ДНК. Для выделения ДНК из каждого изолята C.perfringens использовались наборы «Рибо-Сорб» и «ДНК-Сорб-В» ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (г. Москва) в соответствии с инструкциями изготовителя. Метод выделения основан на специфической обратимой сорбции ДНК в присутствии хаотропных солей (гуанидинтиоцианат, гуанидинхлорид, NaI, и т.д.) на частицы силикагеля.

Диагностика полученных образцов ДНК на присутствие генетического материала C.perfringens производилась с использованием видоспецифических праймеров, сконструированных для выявления генов cpa, cpb1, cpb2, cpetx, cpi и cpe (Baums et al., Yoo et al.). Для оптимизации проводимых исследований мы проводили мультиплексную ПЦР, позволяющих сразу обнаружить несколько генов (cpa, cpb1, cpetx и cpi) и двойную ПЦР для обнаружения генов cpetx и cpi.

Мультиплексная ПЦР проводилась в объеме 25 мкл. Состав реакционной смеси включал универсальный ПЦР буфер, дНТФ, Taq-полимеразу и праймеры, указанные в таблице 1.

Двойная ПЦР проводилась аналогично, но с использованием праймеров, указанных в таблице 2.

Амплификация мультиплексной ПЦР проводилась в следующем режиме:

1 цикл 95°C 2 минуты 30 секунд; 35 циклов 95°C 1 минута, 60°C 1 минута 72°C 1 минута 20 секунд; 1 цикл 72°C 2 минуты.

Режим амплификации двойной ПЦР отличался более низкой температурой отжига праймеров (54°C).

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров и длины продуктов амплификации генов-мишеней токсинов *C.perfringens* (мультиплексная реакция)

Ген	праймер ы (5'-3')	длинна ПА (bp)	авторы
cpa_for *cpa_rev*	AGT CTA CGC TTG GGA TGG AA TTT CCT GGG TTG TCC ATT TC	900	Baums et al. (2)
cpb1_for *cpb1_rev*	TCC TTT CTT GAG GGA GGA TAA A TGA ACC TCC TAT TTT GTA TCC CA	611	Baums et al. (2)
cpefx_for *cpefx_rev*	ACT GCA ACT ACT ACT CAT ACT GTG CTG GTG CCT TAA TAG AAA GAC TCC	541	Yoo et al. (7)
cpi_for *cpi_rev*	AAA CGC ATT AAA GCT CAC ACC CTG CAT AAC CTG GAA TGG CT	293	Baums et al. (2)

Таблица 2

Нуклеотидные последовательности праймеров и длины продуктов амплификации генов-мишеней токсинов *C.perfringens* (двойная реакция)

Ген	праймер ы (5'-3')	длинна ПА (bp)	авторы
cpe_for cpe_rev	TGG GAA CTT CGA TAC AAG CA TTA ACT CAT CTC CCA TAA CTG CAC	396	Baums et al. (2)
cpb2_for cpb2_rev	CAA GCA ATT GGG GGA GTT TA GCA GAA TCA GGA TTT TGA CCA	200	Baums et al. (2)

Продукты ПЦР анализировали путем электрофоретического разделения в 1,5% агарозном геле с использованием красителя SYBR Green I.

Результаты исследования. Ген cpa, ответственный за синтез токсина α, был обнаружен во всех исследованных образцах ДНК. Гены cpb1, cpetx, cpi обнаружены не были, а все выделенные изоляты, идентифицированы как токсинотип (серотип) А (табл. 3(5)). Ген cpa, вместе с cpb2 геном (генотип cpa + cpb2), был обнаружен в 22-х образцах ДНК изолятов C.perfringens, выделенных из фекалий здоровых собак (51,2 %), в 5-и образцах ДНК изолятов, выделенных из фекалий собак с энтеропатия-

Таблица 3

Основные токсины продуцируемые *Clostridium perfringens* (по *Petit L.*(5))

Токсинотипы, серотипы	гены				
	cpa	*cpb*	*etx*	*itx*	*cpb2*
	токсины				
	a	b_1	*ε*	*ι*	b_2
A	+	-	-	-	+/-
B	+	+	+	-	+/-
C	+	+	-	-	+/-
D	+	-	+	-	+/-
E	+	-	-	+	+/-

Таблица 4

Патологические профили, ассоциированные с изолятами *Clostridium perfringens,* выделенных от здоровых и больных собак

Патологический профиль	n	генотип *cpa,* n (%)	генотип *cpa+cpb2,* n (%)
здоровые собаки	43	21 (48,8)	22 (51,2)
метеоризм, геморрагический энтерит, диарея, рвота, водянистый стул	7	2 (28,5)	5 (71,5)
некроз беременной матки	12	11 (91,7)	1 (8,3)
всего	62	34	28

ми (71,5 %). Но, в образцах ДНК изолятов, полученных из содержимого некротизированной матки, генотип cpa + cpb2 встречался только у одной собаки (8,3%). А, в образцах, полученных при вскрытии трупов собак, только в 5 из 27 случаев (18,5%) (табл. 4, 5).

Как видно из таблицы 4, у здоровых собак отмечается приблизительно одинаковая инцидентность генотипов cpa и cpa+cpb2 среди изолятов C.perfringens токсинотипа А, тогда, как у собак с энтеропатиями, отмечается превалирование генотипа cpa+cpb2, он встречается в 71,5% всех случаев поражения ЖКТ.

Интересно отметить, что у собак с летальными синдромами, в выделенных изолятах превалирует генотип cpa. Так, при летальном синдроме «некроз беременной матки» данный генотип определялся в 91,7% случаев. Известно, что при развитии этого синдрома необходимо проводить срочную операцию по ампутации пораженной матки. При геморрагическом синдроме с летальным исходом генотип cpa выделялся в 77,8 %, а при геморрагическом энтерите во всех случаях.

При выделении C. perfringens, от павших животных генотип cpa преобладал в случае смерти от травм, при выраженных дегенеративных процессах в паренхиматозных органах и в тех случаях, когда наблюдался чрезмерно быстрый автолиз отдельных паренхиматозных органов при гистологическом исследовании.

Таблица 5

Патологические профили, ассоциированные с изолятами *Clostridium perfringens*, выделенных при вскрытии трупов собак

Патологический профиль	n	генотип *cpa,* n (%)	генотип *cpa + cpb2,* n (%)
геморрагический синдром	9	7 (77,8)	2 (22,2)
геморрагический энтерит	5	5 (100)	0
смерть от травм	2	2 (100)	0
дегенеративные изменения в паренхиматозных органах	3	2 (66,7)	1 (33,3)
автолиз после смерти в паренхиматозных органах	8	6 (66,7)	2 (33,3)
Всего, n (%)	27	22 (81,5)	5 (18,5)

Выводы. Инцидентность выделения C. perfringens из фекалий здоровых собак составила 17,3%, из фекалий собак с различными поражениями желудочно-кишечного 36,8%, из органов при вскрытии трупов 47,3%. Во всех случаях при постановке диагноза на некроз беременной матки у сук, нами выделена C.perfringens токсинотип (серотип) А, преимущественно генотип cpa.

Таким образом, C.perfringens токсинотип (серотип) А, является основным возбудителем некроза беременной матки у сук, тяжелого заболевания периодически возникающего у сук с дистоциями в жаркое время года. Учитывая, что из фекалий у здоровых собак C.perfringens, выделяется только в 17,3%, случаев, а выделенные изоляты в половине случаев являются генотипом cpa + cpb2, возможно, что источником контаминации матки является не только желудочно-кишечный тракт собаки, но и внешняя среда

Резюме: С помощью полимеразной ценной реакции, набором для мультиплексной идентификации cpa, cpb1, cpetx, cpi генов и двойным набором для идентификации cpe и cpb2 генов кодирующих белки a, β1, ε, ι, β2 энтеротоксинов, были исследованы ДНК, полученные от четырех коллекций различных изолятов Clostridium perfringens. Изоляты первой коллекции были выделены из фекалий 43-х здоровых собак (17,3%). Вторая коллекция получена из фекалий 7-и собак с различными поражениями желудочно-кишечного тракта. Изоляты третьей коллекции были получены из органов при вскрытии 27-и собак, изоляты четвертой коллекции получены из полости удаленных маток от 12-и собак с диагнозом – «некроз беременной матки». Ген cpa ответственный за синтез токсина α, был обнаружен во всех исследованных образцах ДНК. Гены cpb1, cpetx, cpi обнаружены не были, а все выделенные изоляты, идентифицированы как токсинотип (серотип) А (табл. 3(5)). Ген cpa, вместе с cpb2 геном (генотип cpa + cpb2), был обнаружен в 22-

х образцах ДНК изолятов C.perfringens, выделенных из фекалий здоровых собак (51,2 %), в 5-и образцах ДНК изолятов, выделенных из фекалий собак с энтеропатиями (71,5 %). Но, в образцах ДНК изолятов, полученных из содержимого некротизированной матки, генотип cpa + cpb2 встречался только у одной собаки (8,3%). А, в образцах, полученных при вскрытии трупов собак, только в 5 из 27 случаев (18,5%).

SUMMARY

A polymerase chain reaction protocol consisting of a multiplex to identify the cpa, cpbl, cpetx, cpi genes and a duplex to identify the cpe and cpb2 genes encoding for a, β1, ε, ι enterotoxin and β2 toxins, respectively, was applied to DNA extracted from four collections of Clostridium peifringens strains. Strains of the first collection were isolated from the feces of 43 healthy dogs. The second collection was obtained from the feces of 27 dogs with various lesions of the gastrointestinal tract. Third collection of isolates were obtained at autopsy from the bodies of seven dogs, and finally, the fourth collection of isolates obtained from the cavity of the uterus removed 12 dogs diagnosed with - «necrosis of the pregnant uterus.» Cpa gene responsible for synthesis of the toxin α, was detected in all the investigated samples of DNA. Genes cpb1, cpetx, cpi were not detected, and all isolates were identified as toksinotip A. The gene cpa, cpb2 gene, together with (the genotype of cpa + cpb2), was detected in 22 samples of DNA isolates of C. perfringens isolated from the feces of healthy dogs (51.2%), 5 isolates of DNA samples isolated from the feces of dogs with enteropathies (71.5%). However, in samples of DNA isolates obtained from the contents of necrotic uterus cpa + cpb2 genotype found only in one dog (8.3%) and in samples obtained during autopsies of dogs only in 5 out of 27 cases (18.5%).

Keywords: necrosis of the pregnant uterus in bitches, Clostridium perfringens, Clostridial toxin, Genotyping, PCR, Polymerase chain reaction, dogs.

Литература

1. Карташов С.Н. Оценка тяжести эндотоксикоза у собак при некротическом эндометрите беременной матки, вызванном Clostridium perfringens/С.Н. Карташов, Е.В. Карташова, С.В. Лобус, М.Г. Тютякина // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова, 2011 – N 2 – С. 8-11.

2. Baums C.G., Schotte U., Amtsberg G. & Goethe R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of Clostridium perfringens isolates. Vet Microbiol, 100, 2007,p.11-16.

3. Gibert M,, Jolivet-Renaud C. & Popoff M.R. Beta 2 toxin, a novel toxin produced by Clostridium perfringens. Gene, 203, 2010, p. 65-73.

4. Licois D,, Wyers M. & Coudert P. Experimental rabbit enteropathy: experimental transmission and clinical characterisation. Vet Res, 2005. 36, p. 313-601.

5. Petit L,, Gibert M. & Popoff M.R. Clostridium perfringens: toxinotype and genotype. Trends Microbiol, 7 (3), 2009, p. 104-110.

6. Schotte U., Truyen U. & Neubauer H. Significance of p2-toxigenic Clostridium perfringens infections in animals and their predisposing factors - a review. J Vet Med B, 2011, 51, p. 423-426.

7. Yoo H.S., Lee S.U., Park K.Y. & Park Y.H. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of Clostridium perfringens types by multiplex PCR. J Clin Microbiol, 2007, 35 (1), p. 228-232.

Контактная информации об авторах для переписки

Ермакова И.А., Карташов С.Н., Карташова Е.В., Бутенков А.И. - ГНУ Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт, 346421, Ростовское шоссе 0, г. Новочеркасск; e-mail: vitaklinika@rambler.ru